

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ЭЛЕКТРОФОРЕЗА В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ПАРАМФИСТОМАТАТ (ТРЕМАТОДА)

В. В. Клименко и И. В. Величко

Всесоюзный орден Трудового Красного Знамени институт гельминтологии
имени академика К. И. Скрябина, Москва

В работе показано, что исследование белкового состава парамфистоматат методом дискэлектрофореза в полиакриламидном геле может быть объективным критерием в систематике этой группы.

Для изучения процессов филогенеза и уточнения существующих систем животных и растений очень важным и полезным в настоящее время считают использование достижений молекулярной биологии. Одним из таких подходов будет изучение особенностей структуры белков, биосинтез которых происходит под генетическим контролем. Структура одного индивидуального белка отражает лишь незначительную часть генома, поэтому сравнение индивидуальных белков разного происхождения, помимо трудностей очистки, снижает шансы на выявление видовых различий. В связи с этим целесообразно исследование целого набора белков в виде тканевых экстрактов, получение которых несложно. Перспективным методом для выявления видовых различий в белковом составе является метод электрофореза в полиакриламидном геле, позволяющий судить о различиях в первичной структуре белков по электрофоретической подвижности без их предварительной очистки и идентификации. Этот метод зарекомендовал себя в гельминтологии при сравнении белкового состава двух видов фасциол (Клименко, 1966) и нескольких видов аноплоцефалов (Клименко, 1967), разных видов шистозом (Yoshimura, 1968) и парагонимусов (Yoshimura, 1969), гемонхов и остертагий (Чунтонова, 1969).

Однако в белковых спектрах *Dictyocaulus filaria* и *D. viviparus* не было найдено различий (Бережко, 1969). Впоследствии тем же методом были выявлены различия в спектре их гликопротеидов (Бережко, 1971).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для исследования были взяты трематоды подотряда *Paramphistomatata*: *Calicophoron calicophorum* (Fischöder, 1901), *Liorchis scotiae* (Willmott, 1950) и *Gastrothylax crumenifer* (Creplin, 1847), собранные из рубца буйволов на Бакинском мясокомбинате. После предварительной дифференцировки по морфологическим признакам на месте сбора материал был разделен на 4 группы: I — 60 экз. *C. calicophorum*; II — 60 экз. *C. calicophorum*, собранных на следующий день; III — 60 экз. *G. crumenifer*; IV — 23 экз. *L. scotiae*.

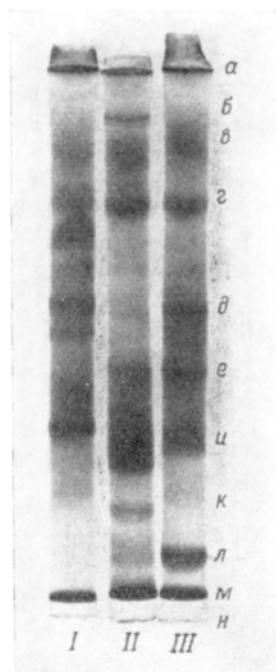
Для уточнения видовой принадлежности из первых трех групп было отобрано по 10 экз., из четвертой — 3 экз. Остальные были использованы для получения белковых экстрактов. Этот материал был доставлен в лабораторию в замороженном состоянии.

Видовую принадлежность гельминтов подтверждали гистологически по методике Нэсмарка (Nasmark, 1937). Экстрагирование белков проводили по Кузовлевой (1960). Концентрацию белка в экстрактах определяли по Лоури (Lowry et al., 1954). Электрофоретическое исследование полученных экстрактов проводили по Davis (1964). Исследовали свежеприготовленные и хранившиеся в течение суток, а также лиофилизированные экстракты. Перед лиофилизацией экстракты освобождали от компонентов невысокого молекулярного веса на колонке с сефадексом Г-25, уравновешенной 1/150 М фосфатным буфером с pH 7.5.

Электрофорез проводили одновременно в 4 трубках (5 мм × 90 мм), заполненных полиакриламидным гелем. Трубки вставляли в самодельную камеру, схему которой дают Успенская с соавторами (1968). Камеру подключали к блоку питания ЭФА-1. Исследуемый образец (200 микрограммов белка на одну трубку) заполимеризовывали в крупнопористый гель. Режим — 8 миллиампер на 4 трубки. После вхождения образца в мелкопористый гель силу тока увеличивали до 11 ма и поддерживали на этом уровне до конца опыта. Продолжительность электрофореза — 70 мин. После окончания опыта гель вынимали из трубок, помещали на 1 час в 1% раствор амидошварца. Избыток красителя отмывали 7% уксусной кислотой. Денситометрию электрофореграмм проводили на немецком денситометре ERJ-65.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Электрофоретический анализ экстрактов, полученных из каждой группы материала, показал значительную их гетерогенность (рис. 1). На электрофореграммах удается различить до двух десятков компонентов



в виде поперечных дисков. Кроме этих дисков, заметна диффузная окрашенность геля, обусловленная, вероятно, лабильными компонентами, которые по тем или иным причинам не могли сконцентрироваться в узкие зоны. В связи с этим довольно трудно определить число отделившихся компонентов. Денситометрическая обработка электрофореграмм (рис. 2) показала также значительное число компонентов (пиков), даже большее, чем удалось воспроизвести на фотоснимке. Но некоторые близко расположенные друг к другу компоненты (например, две полосы у *C. calicophorum* в зоне «б», рис. 1) денситометр сканирует одним пиком (рис. 2).

При сравнении электрофореграмм исследуемых парамфистоматат отчетливо виден характерный для каждого вида белковый спектр, хотя в некоторых участках наблюдается сходство,

Рис. 1. Дисковый электрофорез в полиакриламидном геле белков парамфистоматат.

I — *G. crumenifer*; II — *C. calicophorum*; III — *L. scotiae*. а — катодный конец мелкопористого геля (выше — остатки крупнопористого геля); б—м — характерные участки электрофореграмм (мелкопористый гель); н — анодный конец мелкопористого геля.

причем *C. calicophorum* по белковому спектру оказался ближе к *L. scotiae*, чем к *G. crumenifer*.

Для удобства изложения мы обозначили некоторые самые характерные зоны электрофореграмм буквами русского алфавита. За самой подвижной полосой «м», характерной для всех видов и соответствующей фронту буфера (подвижная граница Кольрауша), у *C. calicophorum* следуют две слабые полосы в зоне «л», тогда как у *L. scotiae* в этом участке имеется одна

чрезвычайно интенсивная полоса, не совпадающая по подвижности с компонентами зоны «л» вышеупомянутого вида (следовательно, и не идентичная какому-либо из них). У *Gastrothylax crumenifer* в этой зоне соответствующих компонентов не обнаруживается. В зоне «к» у *C. calicophorum* имеется одна четкая полоса, характерная только для этого вида, так как у остальных видов на этом участке электрофореграммы полос не имеется. Самым характерным отличием *G. calicophorum* и *L. scotiae* является распределение наиболее интенсивных фракций в зоне «и». У первого такая фрак-



Рис. 2. Денситометрические профили электрофореграмм.

I — *C. calicophorum*; II — *L. scotiae*; III — *G. crumenifer*. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

ция заметно смещена вниз, что свидетельствует о неидентичности структуры белков, давших эти окрашенные зоны.

Следующим отличительным признаком *C. calicophorum* являются две тонкие и очень близко расположенные друг к другу полосы в зоне «б». Подобных полос у остальных видов не наблюдается, хотя в других участ-

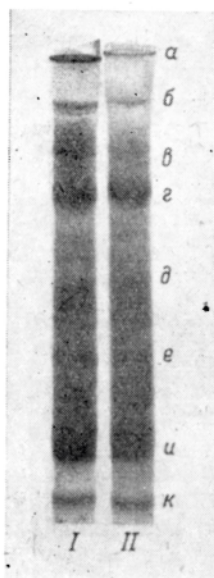
ках геля имеется некоторое сходство. Например, зоны «е» и «г» характерны для всех трех видов. Правда, полоса в зоне «г» *G. crumenifer* гораздо слабее.

Имеется некоторое сходство электрофореграмм всех видов в других зонах, причем большее сходство проявляют *L. scotiae* и *C. calicophorum* (в зонах «д» и «е»). Описанные различия и сходство белковых спектров исследованных видов нашли отражение и на денситограммах, показанных на рис. 2.

При повторном электрофорезе тех же самых экстрактов были получены характерные для них белковые спектры. Хранившиеся экстракты давали несколько худшие по качеству электрофореграммы. Лиофилизированные экстракты дали подобную картину, хотя и менее четкую, чем свежие. После длительного хранения лиофилизированных экстрактов качество электрофореграмм значительно ухудшалось.

Чтобы показать воспроизводимость видовых особенностей белковых спектров, необходимо было не только повторить электрофоретическое исследование одного экстракта, но и получить несколько экстрактов из представителей одного и того же вида. Для этого было проведено отдельно экстрагирование белков из первой и второй групп *C. calicophorum*, упомянутых в разделе «Материал и методы». На рис. 3 показано, насколько точно воспроизводится белковый спектр в разных сериях экстрактов од-

ного и того же вида. Электрофореграммы, представленные на фотоснимке, идентичны. Все белковые зоны на обоих столбиках геля совпадают по подвижности и в основном по интенсивности окраски. Заметна очень незначительная разница в интенсивности окраски лишь некоторых зон. Не совсем точно воспроизведены медленные полосы в зоне «б», но все же в обоих случаях они имеются, тогда как у *L. scotiae* и *G. crumenifer* они отсутствуют. В целом же идентичность двух сравниваемых объектов (рис. 3) не вызывает сомнений. Показано абсолютное совпадение по подвижности самых характерных для *C. calicophorum* белков зоны «и», тогда как у *L. scotiae* подобная фракция, как отмечалось ранее, значительно отстаёт по подвижности. Белковая полоса в зоне «к», характерная только для *C. calicophorum*, хорошо воспроизводится в обеих сериях экстракта. Таким образом, серия материала и возможные погрешности в способе экстрагирования не оказывают существенного влияния на характер электрофореграмм.



ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенная работа показала возможность применения метода электрофореза в полиакриламидном геле для дифференцирования разных родов парамфистомат. При сравнении электрофореграмм исследованных видов вместе с различиями найдено некоторое сходство отдельных белковых компонентов. Большее сходство проявляют *L. scotiae* и *C. calicophorum*, тогда как белковый состав *G. crumenifer* отличается больше. Эти данные согласуются с таксономическим положением

Рис. 3. Воспроизводимость «белковых спектров» в разных сериях материала.

I — экстракт № 2 из 60 других экземпляров того же вида; II — экстракт № 1 из 60 экз. *C. calicophorum*. Остальные обозначения те же, что на рис. 1, 2.

этих червей. *L. scotiae* и *C. calicophorum* принадлежат к одному и тому же семейству *Paramphistomatidae* Fischöder, 1901, тогда как *G. crumenifer* относится к семейству *Gastrothylecidae* Stiles et Goldberger, 1910.

Интересно отметить, что представители разных родов *C. calicophorum* и *L. scotiae* проявляли почти такое же сходство, как два вида фасциол, относящиеся к одному роду, которых исследовал один из авторов (Клименко, 1966). В связи с этим возможно, что дифференцирование отдельных видов парамфистомат окажется более трудным, чем в случае разных видов фасциол. Будет ли наблюдаться корреляция между возможностями общепринятой гельминтологической дифференциации парамфистомат и рекомендуемого нами критерия, покажут исследования белковых спектров представителей одного и того же рода.

Анализируя все немногочисленные литературные данные и собственные исследования по использованию этого метода в таксономии гельминтов, мы считаем, что характер распределения белков по столбику полиакриламидного геля может быть таксономическим признаком, так как он удивительно постоянен и воспроизводится в повторных опытах. Сам способ приготовления экстрактов сразу из большого числа особей исключает индивидуальные или групповые различия, и при хорошей стандартизации способа экстрагирования и условий электрофореза полученные результаты являются объективным признаком, характеризующим исследуемую группу.

Касаясь отличий *L. scotiae* и *C. calicophorum*, мы отмечали важную особенность — несовпадение подвижности интенсивно окрашенных компонентов в зоне «и» у этих видов. Иногда наблюдается несовпадение по-

движности даже идентичных компонентов при параллельном фракционировании одинакового материала в разных трубках. Это бывает обусловлено неодинаковой длиной геля или неравномерностью режима в разных недостаточно стандартных трубках. В этих случаях наблюдается несовпадение и границы Кольрауша. В наших исследованиях в каждом опыте граница Кольрауша на всех электрофореграммах совпадала (рис. 1). Это свидетельствует о стандартности режима в разных гелях в течение одного электрофоретического опыта. Следовательно, несовпадение подвижности белков *L. scotiae* и *C. calicophorum* в зоне «и» обусловлено различиями в структуре сравниваемых белков. Такое же смещение этих белков относительно друг друга мы наблюдали и в повторных опытах. При сравнении же электрофореграмм разных экстрактов из одного и того же вида *C. calicophorum* наблюдается совпадение подвижности этих белков (рис. 3).

Исходя из денситометрических кривых на рис. 2, можно рассчитать количественное соотношение отдельных белковых компонентов. В работах Йосимура (1969, 1969а) денситограммы приводятся как качественная характеристика белковых спектров. В своей работе мы также не приводим цифровых результатов денситометрии. Как показали наши опыты, количественные различия могут быть результатом погрешностей в способе экстрагирования и возможны в пределах одного вида. Более того, мы наблюдали, что изменение положения одного и того же столбика геля при повторном денситометрировании сказывается на соотношении высот отдельных пиков при сохранении общего характера денситограмм. В связи с этим количественная обработка результатов, на наш взгляд, может дать только весьма приблизительную картину. К этому следует добавить недостаточную четкость отделения пиков при значительном фоне. Этот фон, вероятно, обусловлен как недостаточной чувствительностью прибора, так и качеством электрофореграмм. Сложные по составу экстракты дают на электрофореграммах размытый окрашенный фон, обусловленный в какой-то степени качеством красителя, размыванием малых компонентов в результате диффузии, а также денатурацией наиболее лабильных белков.

ВЫВОДЫ

1. Методом электрофореза в полиакриламидном геле выявлены характерные различия в белковом спектре представителей подотряда *Paramphistomatata* (Szidat, 1936)—*Calicophoron calicophorum*, *Liorchis scotiae*, *Gastrothylax crumenifer*.
2. Данный метод может быть использован как дополнительный критерий в таксономии парамфистоматат.

Литература

- Б е р е ж к о В. К. 1969. Антигенная структура половозрелых *Dictyocaulus filaria* и *Dictyocaulus viviparus*. Тез. докл. конф. ВИГИС по законченным в 1968 г. н.-иссл. работам, М.: 7—8.
- Б е р е ж к о В. К. 1971. Анализ антигенной структуры *Dictyocaulus filaria* и *D. viviparus*. Тр. Всесоюз. инст. гельминтол., 17, М.: 281—282.
- К л и м е н к о В. В. 1966. О возможности видовой дифференцировки гельминтов с помощью биохимических методов. Матер. к научн. конф. ВОГ общ. гельминтол., М.: 114—118.
- К л и м е н к о В. В. 1967. Метод электрофореза в полиакриламидном геле — биохимический тест для дифференцировки гельминтов. Бюлл. Всесоюз. инст. гельминтол. им. Скрябина, 1: 61—64.
- К у з о в л е в а О. Б. 1960. Методы выделения и электрофоретического исследования тканевых белков. Методические письма АМН СССР, М.: 1—13.
- У с п е н с к а я В. Д., Н и к о л а е в Е. А. и С м и р н о в М. Н. 1968. Электрофорез белков в крахмальном и полиакриламидном гелях. Современные методы в биохимии, М.: 262—300.
- Ч у н т о н о в а М. И. 1969. Изучение антигенной структуры экстрактов из гемонхусов и остертагий. Тез. докл. конф. ВИГИС по законченным в 1968 г. н.-иссл. работам, М.: 59—60.

- D a v i s B. J. 1964. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. J. Acad. Sci., art., 2, 121 : 404—427.
- L o w r y O. H., R o s e n b r o u g h N. J., F a r r A. L. and R a n d a l l R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 (1) : 265—273.
- N a s m a r k K. E. 1937. A revision of the trematode family Paramphistomatidae. Zool. Bidrag. Uppsala, 16 : 301—566.
- Y o s h i m u r a K. 1968. Disc electrophoretic comparison between *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* adult worms. Japan J. Parasitol., 17 (5) : 382—394.
- Y o s h i m u r a K. 1969. *Paragonimus westermani*, *P. ohirai*, *P. miyazakii*: electrophoretic comparison of whole body proteins. Exptl. Parasitol., 25 (1—3) : 118—130.
- Y o s h i m u r a K. 1969a. *Paragonimus*: electrophoretic fractionation of whole body proteins as an aid in specific identification of a species from Sado Island, Japan. Exptl. Parasitol., 25 (1—3) : 107—117.

TO THE POSSIBLE USE OF ELECTROPHORESIS
ON POLYACRYLAMIDE GEL FOR THE DIFFERENTIATION
OF PARAMPHISTOMATATA (TREMATODA)

V. V. Klimenko and I. V. Velichko

S U M M A R Y

The disc electrophoresis on polyacrylamide gel demonstrated characteristic differences in the protein spectrum of some representatives of the suborder *Paramphistomatata* (Szidat, 1936) — *Calicophoron calicophorum*, *Liorchis scotiae*, *Gastrothylax crumenifer*. This method may be used as an additional criterion for the taxonomy of *Paramphistomatata*.
